

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003459

International filing date: 02 March 2005 (02.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-060261  
Filing date: 04 March 2004 (04.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

03.03.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2004年 3月 4日

出願番号  
Application Number: 特願2004-060261

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

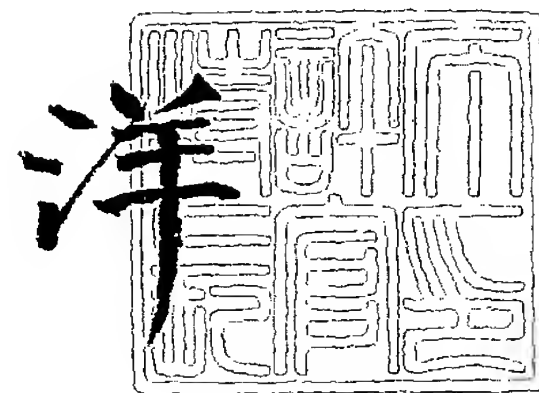
J P 2 0 0 4 - 0 6 0 2 6 1

出願人  
Applicant(s): 独立行政法人科学技術振興機構

2005年 4月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



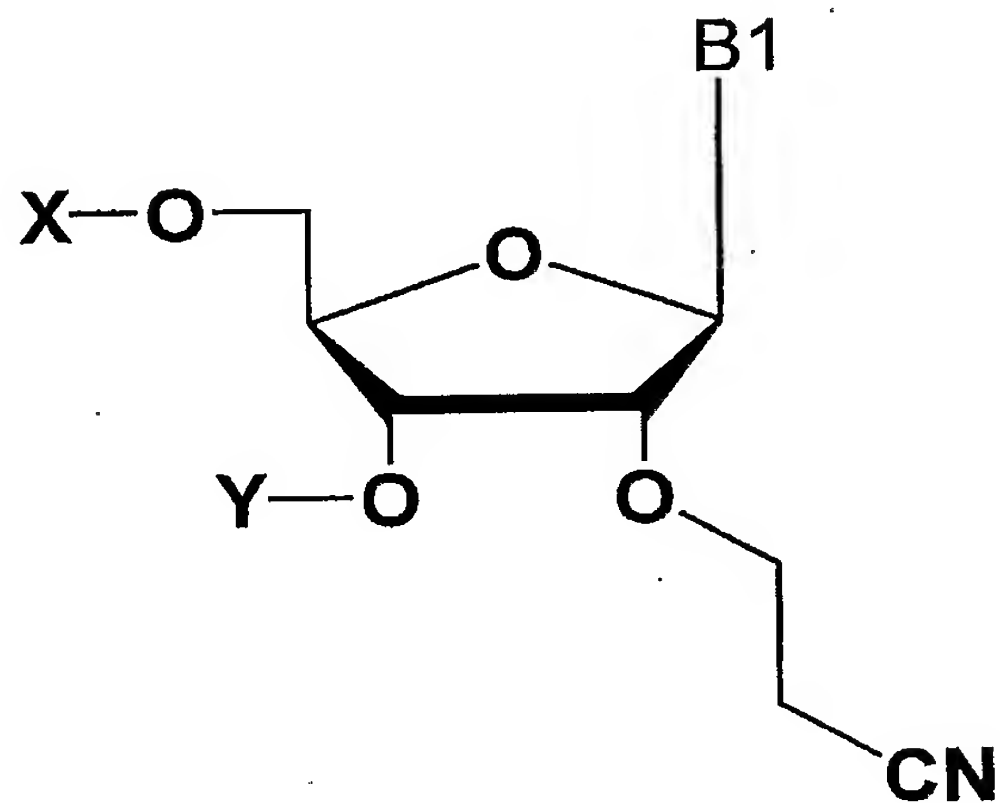
【書類名】 特許願  
【整理番号】 AB04014J  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1 - 2 6 - 4 6  
    【氏名】 関根 光雄  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区しらとり台 4 8 - 5 第 2 パークサイド内  
    田 1 0 2  
    【氏名】 清尾 康志  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区千草台 1 0 - 2 0  
    【氏名】 実吉 尚郎  
【特許出願人】  
    【識別番号】 503360115  
    【氏名又は名称】 独立行政法人 科学技術振興機構  
【代理人】  
    【識別番号】 100100181  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 阿部 正博  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 053419  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0316565

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

一般式 (I) で表されるヌクレオシド又はそのヌクレオチド:

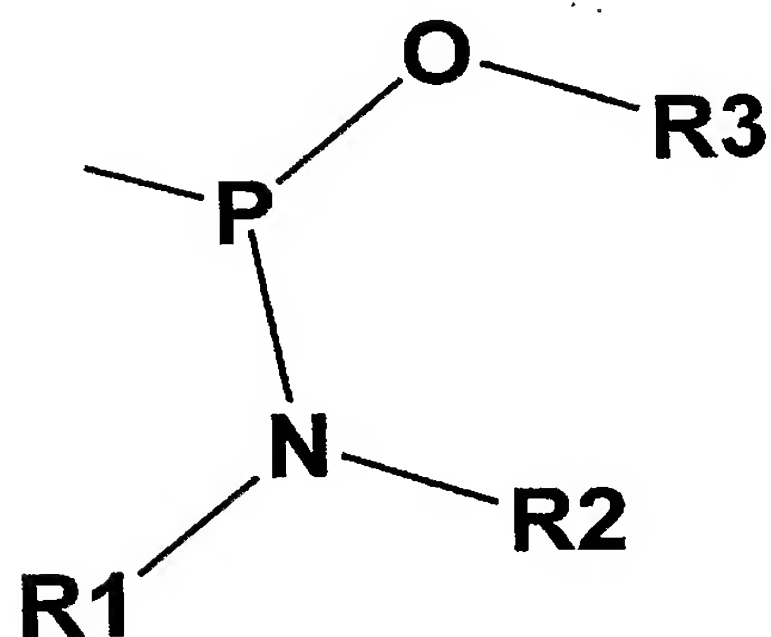
【化 1】



(I)

(式 I 中、X 及び Y は同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4-メトキシトリチル基、4,4'-ジメトキシトリチル基、又は一般式 (II) :

【化 2】



(II)

(式 (II) 中、R1 および R2 は同一または異なって、炭素数 1 から 7 のアルキル基を表すか、又は、R1 および R2 が互いに結合して環構造を形成し、R3 はリン酸の保護基を表す) を表し、B1 は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。)

【請求項 2】

2'-O-シアノエチルウリジンである、請求項 1 記載のヌクレオシド。

【請求項 3】

N-4-ジメチルアミノメチレン-2'-O-シアノエチルシチジンである、請求項 1 記載のヌクレオシド。

【請求項 4】

N6-ジメチルアミノメチレン-2'-O-シアノエチルアデノシンである、請求項1記載のヌクレオシド。

【請求項5】

N2-ジメチルアミノメチレン-6-O-トリイソプロピルベンゼンスルホニル-2'-O-シアノエチルグアノシンである、請求項1記載のヌクレオシド。

【請求項6】

2'-O-シアノエチルシチジンである、請求項1記載のヌクレオシド。

【請求項7】

2'-O-シアノエチルアデノシンである、請求項1記載のヌクレオシド。

【請求項8】

2'-O-シアノエチルグアノシンである、請求項1記載のヌクレオシド。

【請求項9】

請求項1～8の何れか一項に記載のヌクレオシドの合成方法であって、炭酸セシウム、DBU、及びTriton Bから成る群から選択される少なくとも一種の化合物とアクリロニトリルとヌクレオシド誘導体を合成原料として用い、t-ブチルアルコールの存在下又は非存在下で、2'水酸基をシアノエチルエーテル化することを特徴とする、前記合成方法。

【請求項10】

炭酸セシウム、DBU、及びTriton Bから成る群から選択される少なくとも一種の化合物をヌクレオシド誘導体に対して0.1～30 equivの範囲で反応系に存在させ、アクリロニトリルに対して、0.05～30 equivの範囲のt-ブチルアルコールの存在下に反応を行う、請求項9記載の合成方法。

【請求項11】

炭酸セシウムを用いる、請求項9又は10に記載の合成方法。

【請求項12】

20℃～30℃の温度範囲で反応させる、請求項9～11の何れか一項に記載の合成方法。

【請求項13】

反応時間が2時間～3時間の範囲である、請求項9～12の何れか一項に記載の合成方法。

【請求項14】

請求項1ないし8のいずれか一項に記載のヌクレオシドを含むRNAオリゴマー。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 2 ‘水酸基を修飾された新規人工RNA

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、2 ‘水酸基をシアノエチルエーテル化したヌクレオシド、ヌクレオチド及びそれらのホスホロアミダイト化合物に関する。これらの化合物は、核酸合成試薬としてまた修飾RNAとして各々用いることができる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

化学的に合成されたオリゴリボヌクレオチド（オリゴRNA）は、遺伝子解析用のRNAプローブ、RNA医薬品素材（アンチセンスRNA、リボザイム、iRNAを利用した遺伝子発現制御）、人工酵素、アプタマーとして利用することが可能である。

【0 0 0 3】

2 ‘水酸基をメチルエーテル誘導体は市販されていることもあり、エーテル修飾体として汎用されている。しかしながらこの修飾RNAでは、遺伝子制御物質として用いる場合細胞内における酵素耐性の点で問題がある。一方、同様のエーテル型修飾としてメトキシエチルエーテル誘導体も汎用されている。こちらの化合物は、メチル修飾体と比較して酵素耐性の点で優れていると報告されている（非特許文献1）。しかし、それらの調製には、導入法や導入試薬に制限がつくためピリミジンヌクレオシド、プリンヌクレオシドに共通な合成法がないのが現状である。また、エーテル鎖中に存在する酸素原子の影響によりエーテル鎖の構造が制限されているためオリゴRNA合成の際、縮合効率の点で問題が生じる可能性が十分考えられる。

【0 0 0 4】

これらの問題点を解決するには、炭素数が3炭素程度でエーテル鎖中に酸素原子を含まず末端に電子吸引力でかつ親水性置換を有するエーテル修飾体の開発を行うことが有用である。

【0 0 0 5】

【非特許文献1】 VonPierre Martin, ヘルベチカ チミカ アクタ, 1995, 78, 486-504

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

上記のような条件を満たすエーテル修飾体としてシアノエチルエーテルが考えられる。このエーテルはアクリロニトリルを導入試薬とすることで安価に修飾体が得られるという利点がある。しかし、導入には強塩基例えば水酸化ナトリウムなどを用いて加熱という過酷な条件を要する問題点があった。また、機能性官能基としての可能性は核酸化学において開拓されていない。

【0 0 0 7】

本発明は、穏やかな条件で効率的にシアノエチルエーテルを構築する系、及び機能性官能基としての可能性を開拓し新規機能性核酸の創製に寄与することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 8】

そこで、本発明者は、アクリロニトリルを2-シアノエチル化の合成原料に用いるとともに、水酸基を活性化する塩基として最適なものを探索した結果、本発明を完成した。

【0 0 0 9】

即ち、本発明は、一般式（I）で表されるヌクレオシド又はそのヌクレオチド（式I中、X及びYは同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4-メトキシトリチル基、4, 4’-ジメトキシトリチル基、又は一般式（II）（式（II）中、R1およびR2は同一または異なって、炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、R1およびR2が互いに結合して環構造を形成し、R3はリン酸の保護基を表す）を表し



、B1は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。)に係る。

#### 【0010】

更に、本発明は、上記一般式(I)で表されるヌクレオシドの合成方法であって、炭酸セシウム、DBU、及びTriton Bから成る群から選択される少なくとも一種の化合物とアクリロニトリルとヌクレオシド誘導体を合成原料として用い、t-ブチルアルコールの存在下又は非存在下で、2'水酸基をシアノエチルエーテル化することを特徴とする、前記合成方法に係る。

#### 【0011】

本発明は又、これら合成方法で得られたヌクレオシドのホスホロアミダイト化合物にも係る。尚、本発明のホスホロアミダイト化合物は、当業者に公知のホスホロアミダイト法を用いて、当業者であれば容易に調製することが出来る。更に、本発明は上記ヌクレオシド(一般式(I)におけるX及びYを除いた部分)を含むRNAオリゴマーにも係る。

#### 【発明の効果】

#### 【0012】

本発明のシアノエチル化反応により種々の水酸基のシアノエチル化を効率よく実施することが可能となった。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0013】

本発明化合物におけるホスホロアミダイト基(II)中、R1およびR2は同一または異なって、イソプロピル基等の炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、R1およびR2が互いに環構造を形成する。又、リン酸の保護基であるR3は、例えば、2'-シアノエチル基、4'-ニトロフェニルエチル基、N-(トリフロロアセチル)アミノブチル基、又は、4-[N-メチル-N-(2,2,2-トリフルオロアセチル)アミノ]ブチル基を挙げることが出来、2'-シアノエチル基が好適である。

#### 【0014】

本発明の合成方法において、炭酸セシウム、DBU、及びTriton Bから成る群から選択される少なくとも一種の化合物、特に、好適には炭酸セシウムの存在下で、合成原料としてアクリロニトリル及びヌクレオシド誘導体を用いる合成方法であり、これら化合物はヌクレオシド誘導体に対して0.1~30equivの範囲で反応系に存在させ、更に、アクリロニトリルに対して0.05~30equivの範囲のt-ブチルアルコールの存在下に反応を行うことが好適である。通常、20℃~30℃の温度範囲で反応させることが好ましく、又、反応時間が、2時間~3時間の範囲であることが好ましい。

#### 【実施例】

#### 【0015】

以下、実施例に則して本発明を更に詳しく説明する。尚、本発明の技術的範囲はこれらの記載によって何等制限されるものではない。

#### 【0016】

実施例1： 2'水酸基を修飾されたRNAの合成(1)

N3-ベンゾイル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリデン-ウリジン化合物(591mg, 1mmol)をt-ブチルアルコール(5ml)に溶解させた。そこにアクリロニトリル(1.3ml, 20mmol)、引き続き炭酸セシウム(353mg, 1mmol)を加え2時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン：酢酸エチル=3:1)により精製し白色結晶として化1の化合物：N3-ベンゾイル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリデン-2'-O-シアノエチルウリジン(593mg, 0.921mmol)を収率92%で得た。分析用サンプルにはクロロホルム-ジイソプロピルエーテルから結晶化したものを用いた。

m. p. 159℃

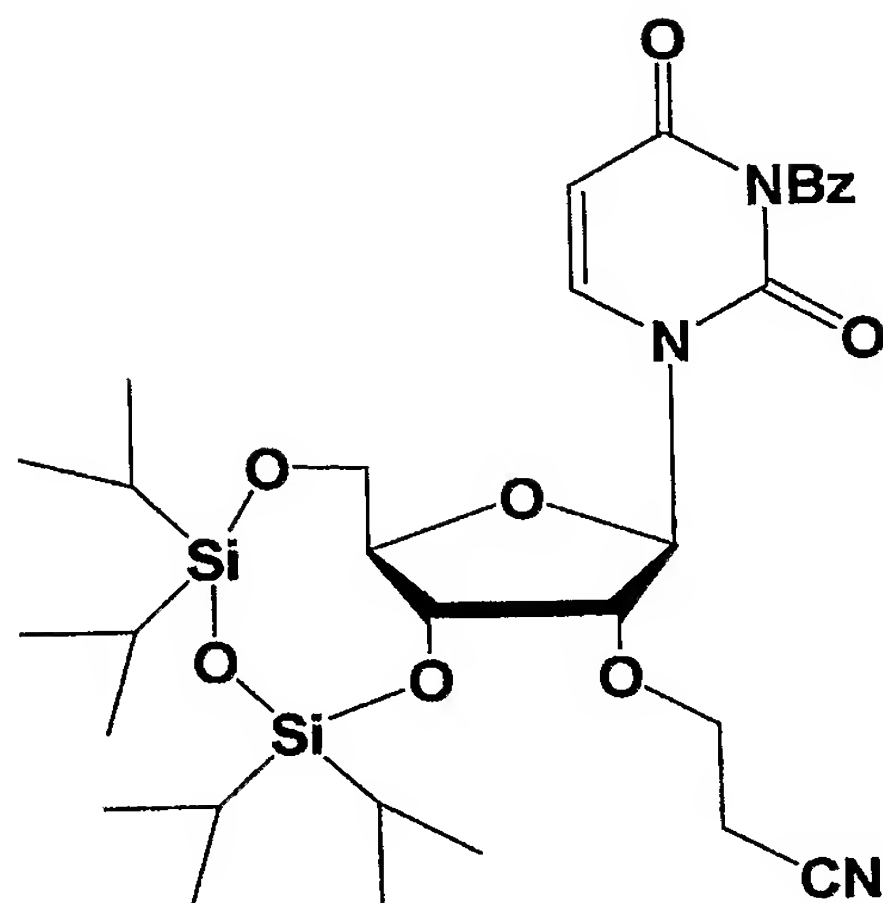
#### 【0017】

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 0.94-1.12(28H, m),

2.61 - 2.63 (2H, m), 3.91 - 4.05 (4H, m), 4.18 - 4.29 (3H, m), 5.70 (1H, s), 5.79 (1H, d, J = 8.30), 7.49 - 7.94 (5H, m), 8.00 (1H, d, J = 8.30)

【0018】

【化1】



【0019】

得られた化合物 (322 mg, 0.545 mmol) をテトラヒドロフラン (3 ml) に溶解させ、あらかじめ調製したテトラブチルアンモニウムフルオリド (327 mg, 1.25 mmol) と酢酸 (72  $\mu$ l, 1.25 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (2 ml) をゆっくりと滴下した。1時間攪拌させた後、反応液をクロロホルムで希釈し飽和食塩水で3回洗浄した。有機層を分離後、水層をクロロホルムで抽出した。有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:アセトン=10:1) により精製し白色泡状物質として化2の化合物: N3 - ベンゾイル - 2' - O - シアノエチルウリジン (147 mg, 0.366 mmol) を収率67%で得た。

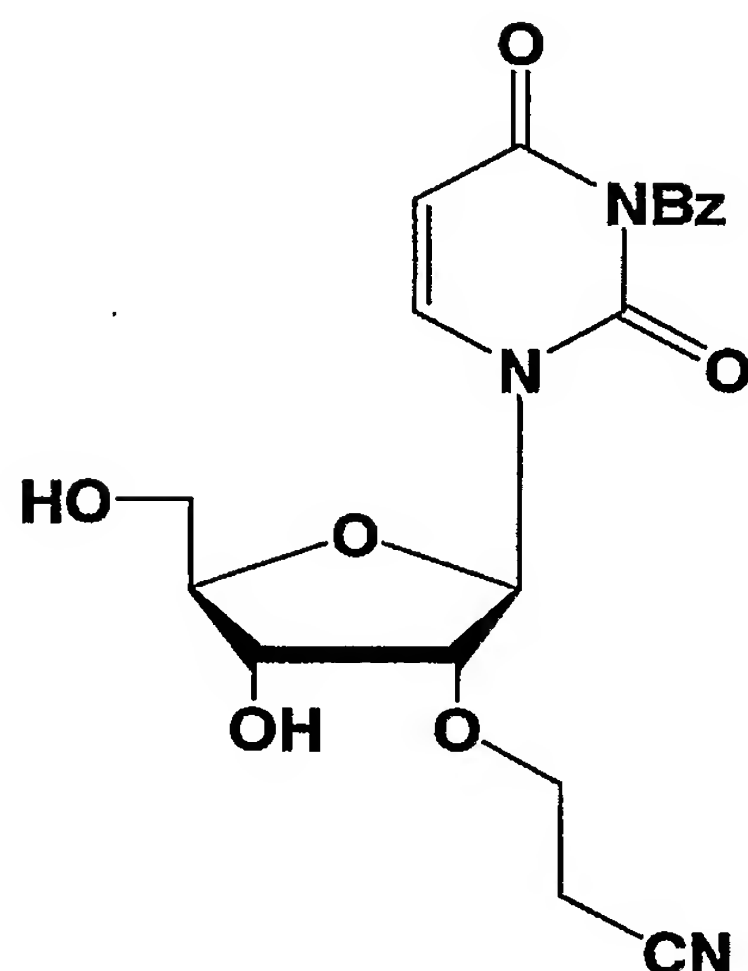
【0020】

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 2.63 - 2.66 (2H, m), 3.83 - 3.90 (2H, m), 4.04 - 4.09 (4H, m), 4.31 (1H, dd, J = 5.37, 7.32), 5.81 (1H, d, J = 1.71), 5.83 (1H, d, J = 8.30), 7.50 - 7.94 (5H, m), 8.10 (1H, d, J = 8.30)

【0021】



## 【化2】



## 【0022】

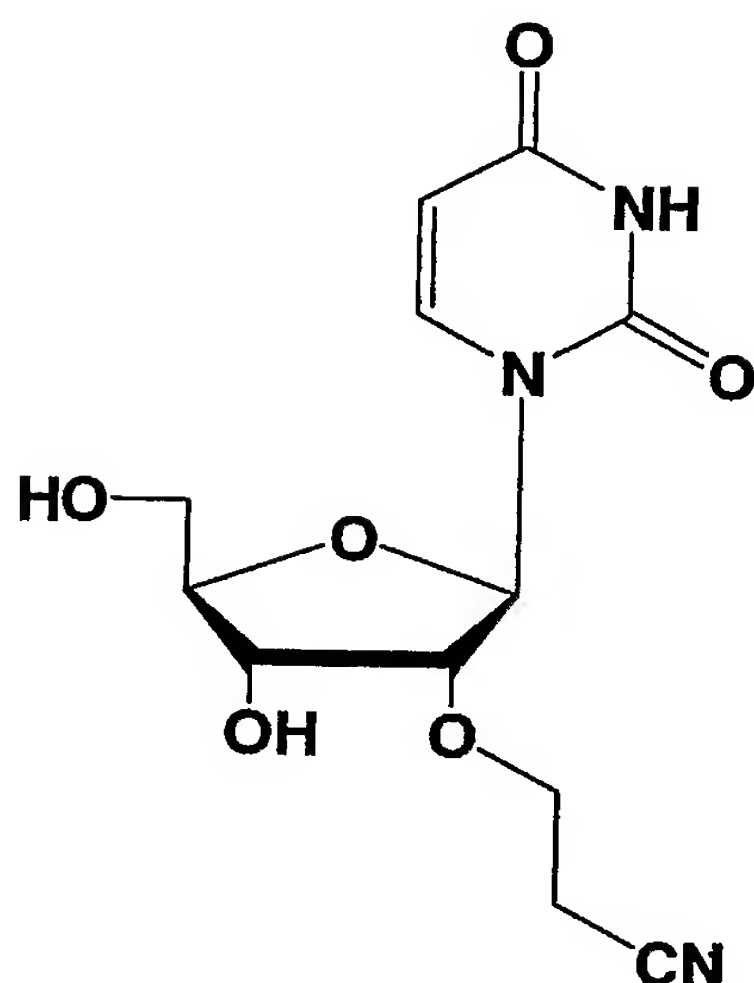
得られた化合物 (80 mg, 0.202 mmol) をエタノール：アンモニア水 (2 ml, 3:1, v/v) に溶解させ3時間攪拌した。その後、減圧濃縮して得られた残渣を1 mlのメタノールに溶かし10 mlのエーテルで希釈して3 mlの蒸留水で3回抽出した。水層を減圧濃縮し、得られた残渣を球状シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム：メタノール=5:1) で精製し白色泡状物質として化3の化合物：2'-O-シアノエチルウリジン (57 mg, 0.191 mmol) を収率95%で得た。

## 【0023】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) 2.70 - 2.72 (2H, m), 3.69 (1H, dd,  $J=4.15, 12.9$  Hz), 3.82 - 3.85 (3H, m), 4.02 - 4.04 (1H, m), 4.08 (1H, dd,  $J=3.66, 5.23$ ), 4.19 (1H, t,  $J=5.62, 6.10$ ), 5.77 (1H, d,  $J=8.06$ ), 5.87 (1H, d,  $J=3.66$ ), 7.80 (1H, d,  $J=8.06$ )

## 【0024】

## 【化3】



## 【0025】

実施例2：ホスホロアミダイト化合物の合成（1）

実施例1の出発化合物（2.70 g, 4.19 mmol）をテトラヒドロフラン（20 ml）に溶解させ、あらかじめ調製したテトラブチルアンモニウムフルオリド（2.75 g, 10.5 mmol）と酢酸（0.6 ml, 10.5 mmol）のテトラヒドロフラン溶液（20 ml）をゆっくりと滴下した。7時間攪拌させた後、反応液をクロロホルムで希釈し飽和食塩水で3回洗浄した。水層をクロロホルムで抽出し、有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：アセトン＝10：1）により精製し化合物3を得た。引き続き、乾燥ピリジンにて3回共沸脱水を行い、乾燥ピリジン（40 ml）に溶解させた。塩化ジメトキシトリチル（1.71 g, 5.04 mmol）を加えて7時間攪拌させた後、反応系に水を加えて反応を停止した。減圧濃縮して得られた残渣をクロロホルムで希釈し、飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1）で精製し白色泡状物質として化4の化合物：5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-シアノエチルウリジン

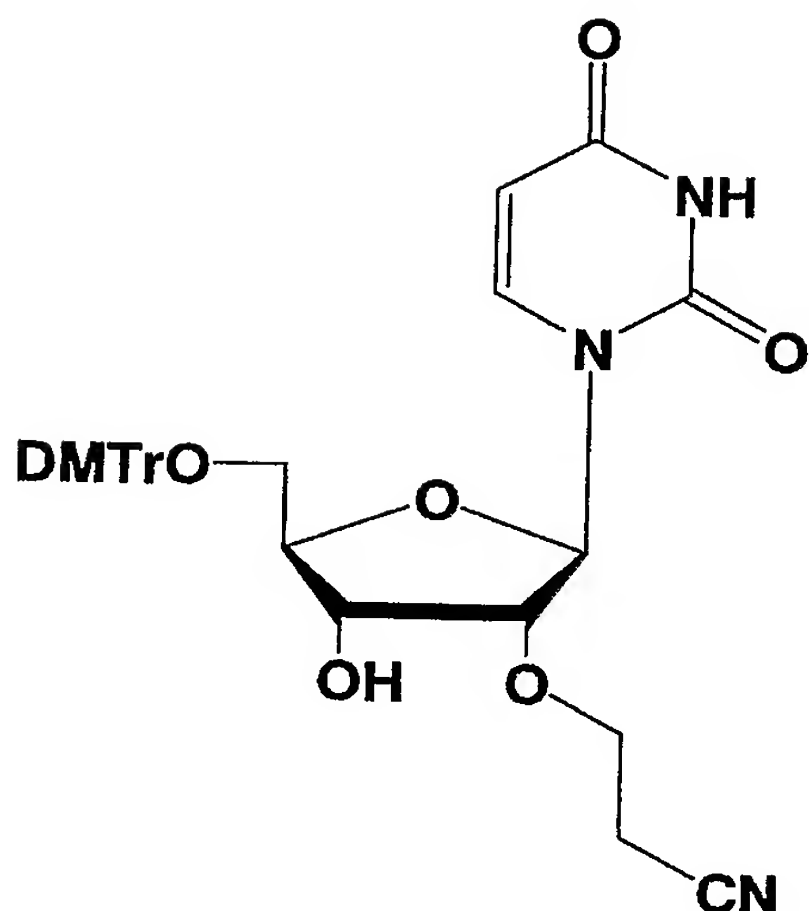
（2.07 g, 2.84 mmol）を収率70%で得た。

## 【0026】

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 2.55 - 2.62 (3H, m), 3.57 - 3.64 (2H, m), 3.79 - 3.86 (7H, m), 4.00 (1H, d,  $J=5.13$ ), 4.04 - 4.07 (1H, m), 4.12 - 4.15 (1H, m), 4.53 (1H, ddd,  $J=5.13$ , 9.40, 9.52), 5.37 (1H, d,  $J=8.30$ ), 5.86 (1H, s), 6.86 (4H, dd,  $J=1.22$ , 8.79), 7.24 - 7.34 (7H, m), 7.42 (2H, br), 7.49 (2H, br), 7.64 (2H, br), 7.93 (2H, br), 8.22 (1H,  $J=8.30$ )

## 【0027】

## 【化4】



## 【0028】

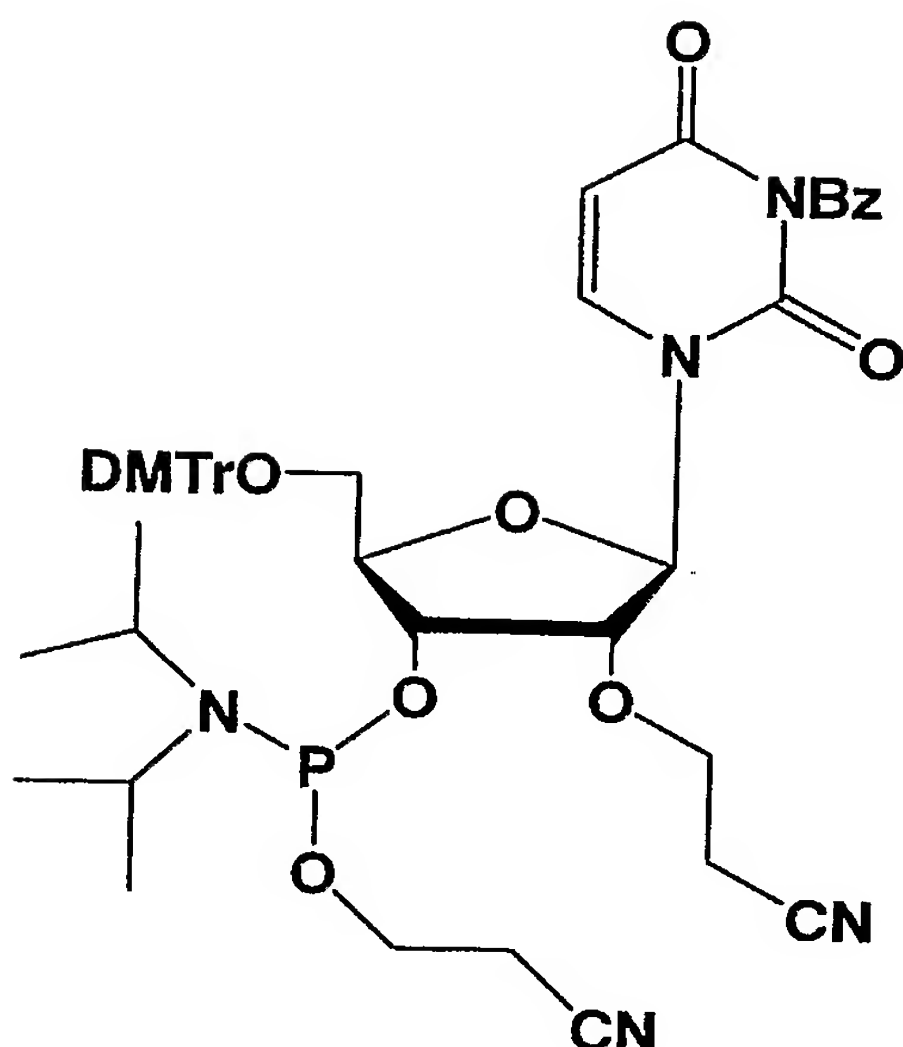
アルゴン雰囲気下、五酸化ニリンを乾燥剤としてデシケータにて減圧乾燥させた上記化合物 (1.06 g, 1.51 mmol) とテトラゾールジイソプロピルアンモニウム塩 (193 mg, 2.25 mmol) を乾燥アセトニトリル (7 ml) に溶解させた。2-シアノエチルN, N, N, N-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (678 mg, 2.25 mmol) を乾燥アセトニトリル (3 ml) の溶液として反応系に滴下した。5時間撹拌した後、反応液をクロロホルムで希釈し飽和食塩水で2回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した。水層をクロロホルムで抽出し、得られた有機層を合わせて無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣を球状シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=1:1 0.5% トリエチルアミン) で精製し白色泡状物質として化5の化合物: 5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-シアノエチルウリジン2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルホスホロジアミダイト (1.27 g, 1.40 mmol) を収率93%で得た。

## 【0029】

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 1.08 - 1.30 (12H, m), 2.47 - 2.68 (4H, m), 3.49 - 4.30 (16H, m), 4.59 - 4.80 (1H, br), 5.28 - 5.37 (1H, m), 5.85 (1H, m), 6.83 - 6.91 (4H, m), 7.24 - 7.66 (13H, m), 8.00 - 8.03 (2H, m), 8.24 - 8.30 (1H, m)

## 【0030】

【化5】



【0031】

実施例 3 : 2 ‘水酸基を修飾された RNA の合成 (2)

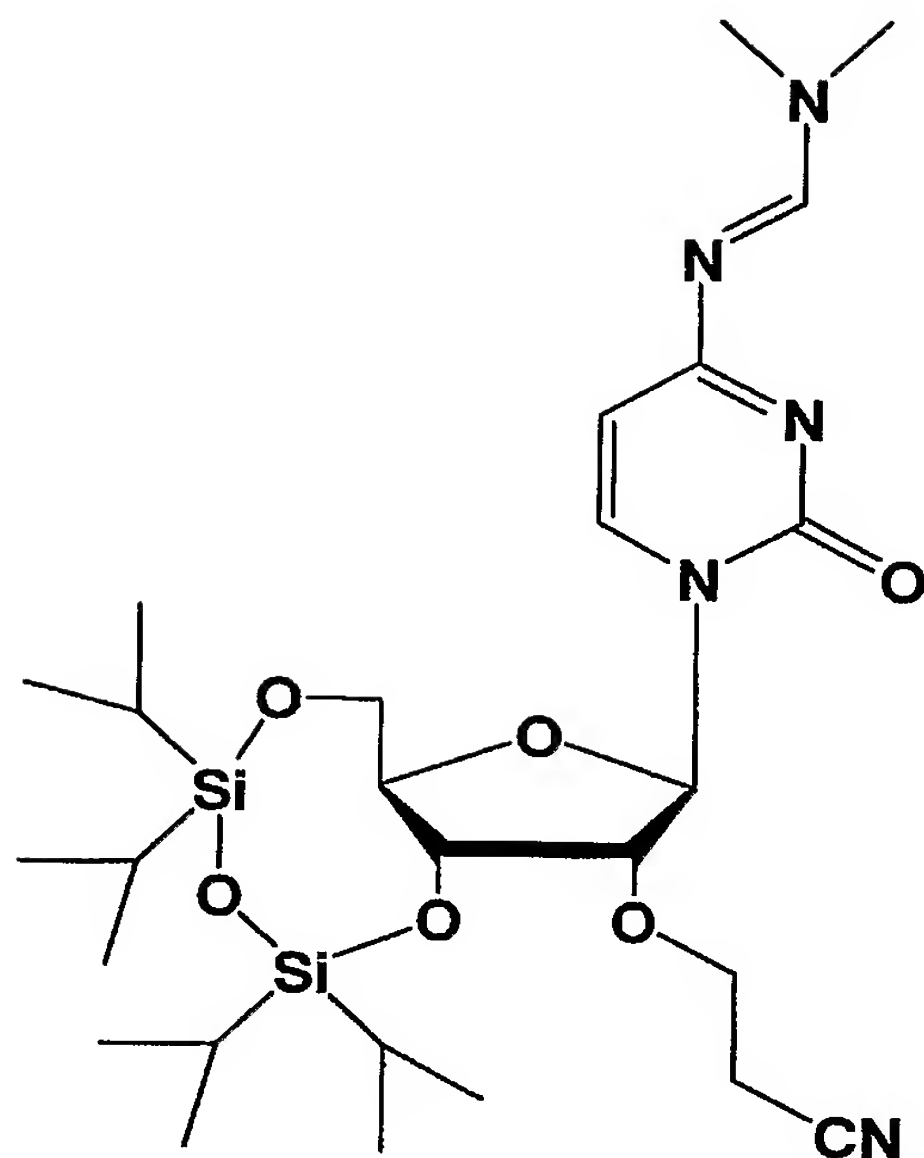
N4 - ジメチルアミノメチレン - 3' , 5' - O - テトライソプロピルジシロキサニリデン - シチジン (541 mg, 1 mmol) を t - ブチルアルコール (5 ml) に溶解させた。そこにアクリロニトリル (1.3 ml, 20 mmol) 、引き続き炭酸セシウム (353 mg, 1 mmol) を加え 3 時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム : メタノール (40 : 1) で精製し化 6 の化合物 : N4 - ジメチルアミノメチレン - 3' , 5' - O - テトライソプロピルジシロキサニリデン - 2' - O - シアノエチルシチジン (528 mg, 89%) を得た。

【0032】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 0.85 - 1.06 (28H, m), 2.69 - 2.73 (2H, m), 3.10 (3H, s), 3.12 (3H, s), 3.86 - 4.24 (7H, m), 5.74 (1H, s), 6.01 (1H, dd), 8.01 (1H, d), 8.76 (1H, s)

【0033】

## 【化6】



## 【0034】

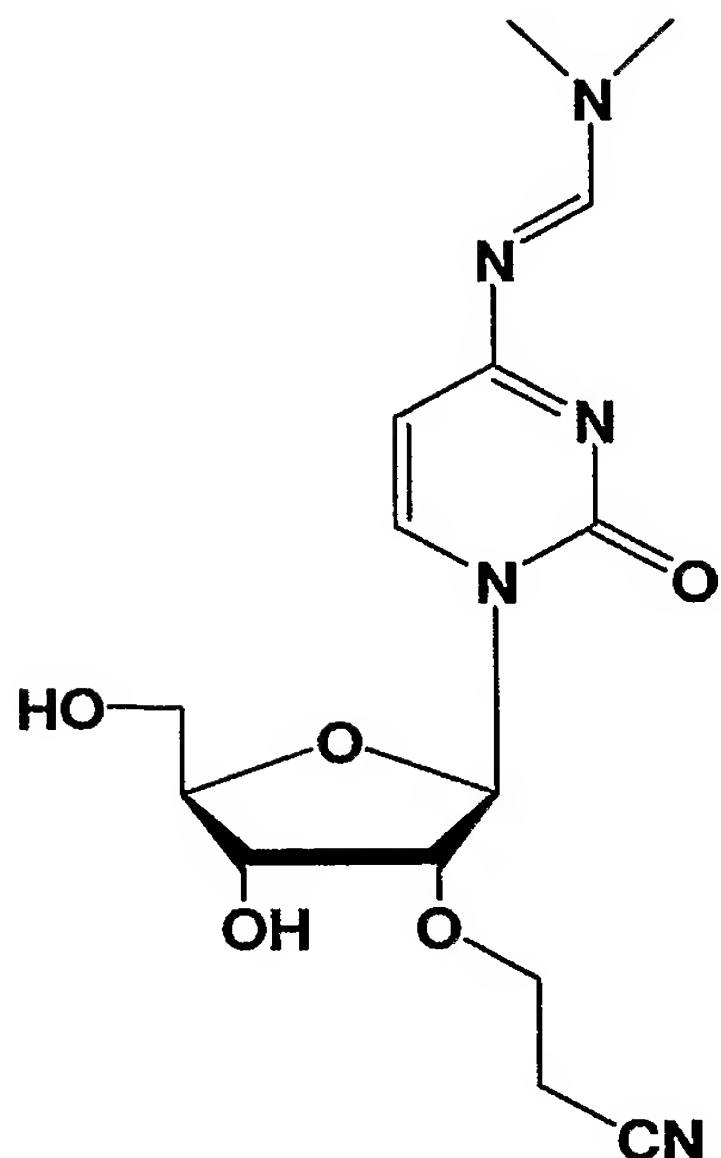
得られた化合物(347 mg, 0.584 mmol)をテトラヒドロフラン 6 ml に溶解させた。そこにトリエチルアミン3フッ化水素(1.3 ml, 20 mmol)、引き続きトリエチルアミン(353 mg, 1 mmol)を加え1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール(100：0から50：1)で精製し化7の化合物：N4-ジメチルアミノメチレン-2'-O-シアノエチルシチジン(184 mg、90%)を得た。

## 【0035】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 0.85 - 1.06 (28H, m), 2.69 - 2.73 (2H, m), 3.10 (3H, s), 3.12 (3H, s), 3.86 - 4.24 (7H, m), 5.74 (1H, vs), 6.01 (1H, dd), 8.01 (1H, d), 8.76 (1H, s)

## 【0036】

## 【化7】



## 【0037】

実施例4：ホスホアミダイト化合物の合成（2）

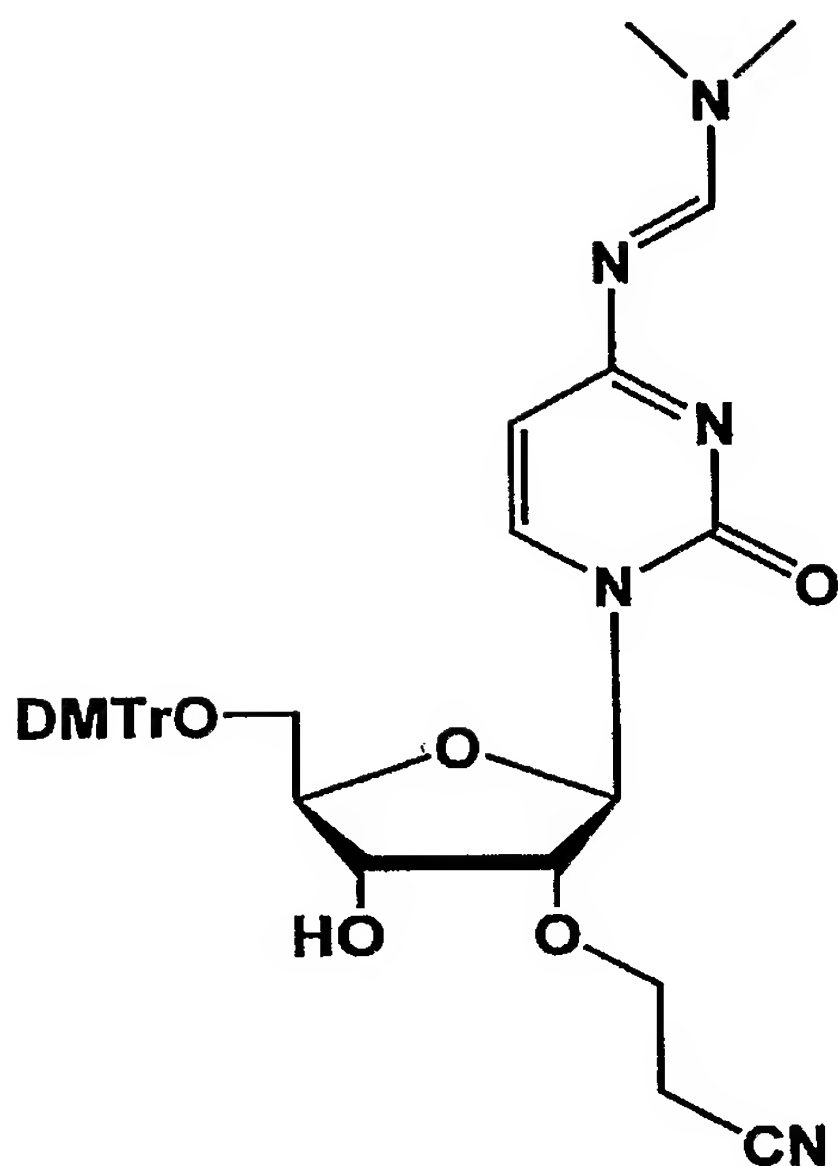
実施例3の化合物（192 mg, 0.546 mmol）をピリジン（5 ml）に溶解させた。そこにジメトキシトリチルクロリド（204 mg, 0.602 mmol）を加え2時間撹拌する。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムで希釈し飽和食塩水並びに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。さらに水層をクロロホルムで3回逆抽出し有機層とあわせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ別した後、減圧濃縮し得られた残渣を得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール（100：0から25：1）で精製し化8の化合物：N4-ジメチルアミノメチレン-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-シアノエチルシチジン（157 mg, 45%）を得た。

## 【0038】

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 2.69-2.73 (2H, br), 3.10 (3H, s), 3.12 (3H, s), 3.49 (1H, dd), 3.57-3.59 (1H, m), 3.77 (6H, s), 3.94-4.07 (3H, m), 4.31-4.41 (2H, m), 5.76 (1H, d), 5.93 (1H, s), 6.82-6.85 (4H, m), 7.20-7.43 (9H, m), 8.16 (1H, dd), 8.76 (1H, s)

## 【0039】

## 【化 8】



## 【0040】

実施例 5 : 2 ‘水酸基を修飾された RNA の合成 (3)

N6 - ジメチルアミノメチレン - 3', 5' - O - テトライソプロピルジシロキサニリデン - アデノシン化合物 (565 mg, 1 mmol) を t - ブチルアルコール (5 ml) に溶解させた。そこにアクリロニトリル (1.3 ml, 20 mmol)、引き続き炭酸セシウム (353 mg, 1 mmol) を加え 3 時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム : メタノール (50 : 1) で精製し化 9 の化合物 : N6 - ジメチルアミノメチレン - 3', 5' - O - テトライソプロピルジシロキサニリデン - 2' - O - シアノエチルアデノシン (559 mg, 90%) を得た。

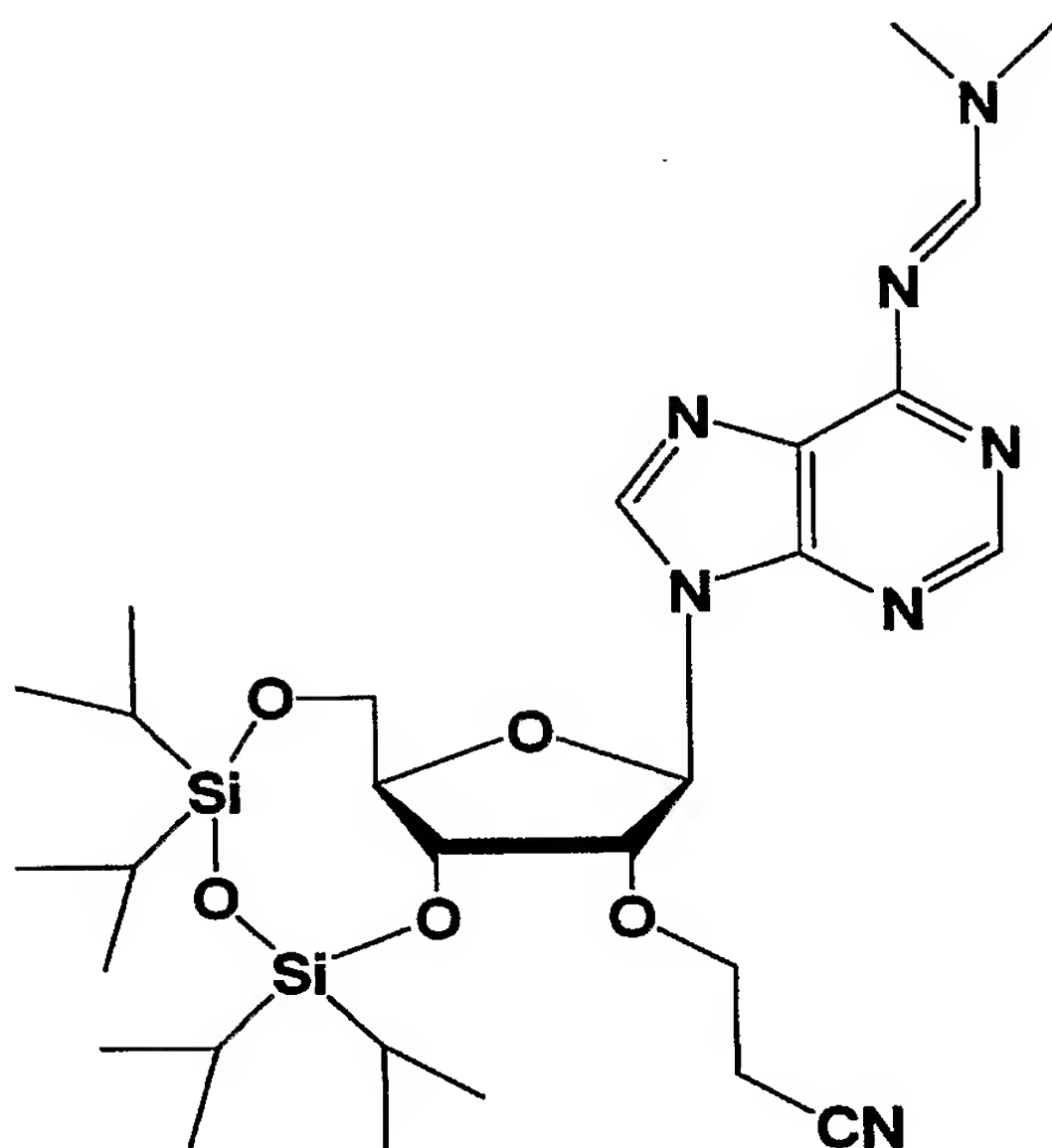
## 【0041】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 0.96 - 1.12 (28 H, m), 2.71 - 2.73 (2 H, m), 3.19 (3 H, s), 3.25 (3 H, s), 3.94 - 4.27 (6 H, m), 4.77 (1 H, dd), 6.01 (1 H, s), 8.14 (1 H, s), 8.48 (1 H, s), 8.93 (1 H, s)

## 【0042】



## 【化9】



## 【0043】

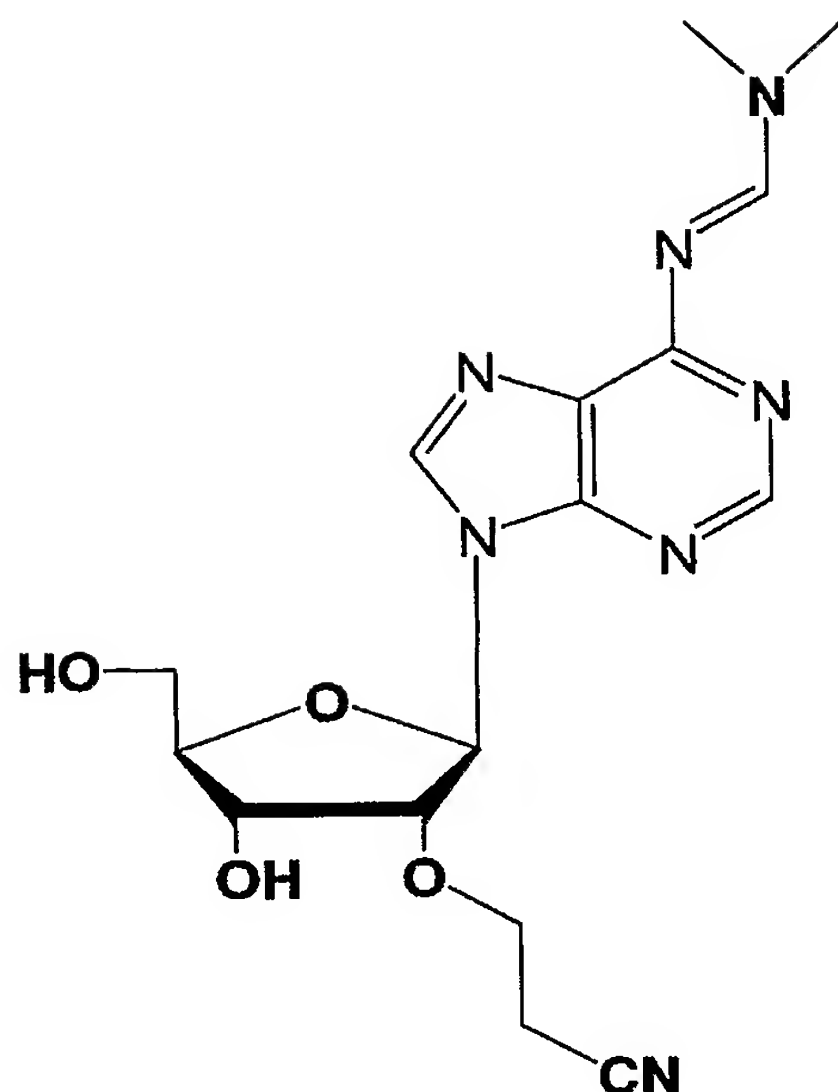
得られた化合物(1.45 g, 2.35 mmol)をテトラヒドロフラン24 mlに溶解させた。そこにトリエチルアミン3フッ化水素(1.3 ml, 20 mmol)、引き続きトリエチルアミン(589  $\mu$ l, 1 mmol)を加え1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール(50：1から25：1)で精製し化合物：N6-ジメチルアミノメチレン-2'-O-シアノエチルアデノシン(878 mg, quant)を得た。

## 【0044】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 2.62 - 2.65 (2H, m), 3.16 (3H, s), 3.18 (3H, s), 3.65 - 3.72 (4H, m), 3.80 - 3.86 (4H, m), 4.09 - 4.11 (1H, m), 4.43 (1H, t), 4.53 (1H, t), 6.08 (1H, d), 8.34 (1H, s), 8.40 (1H, s), 8.83 (1H, s)

## 【0045】

【化 10】



【0046】

実施例 6：ホスホロアミダイト化合物の合成 (3)

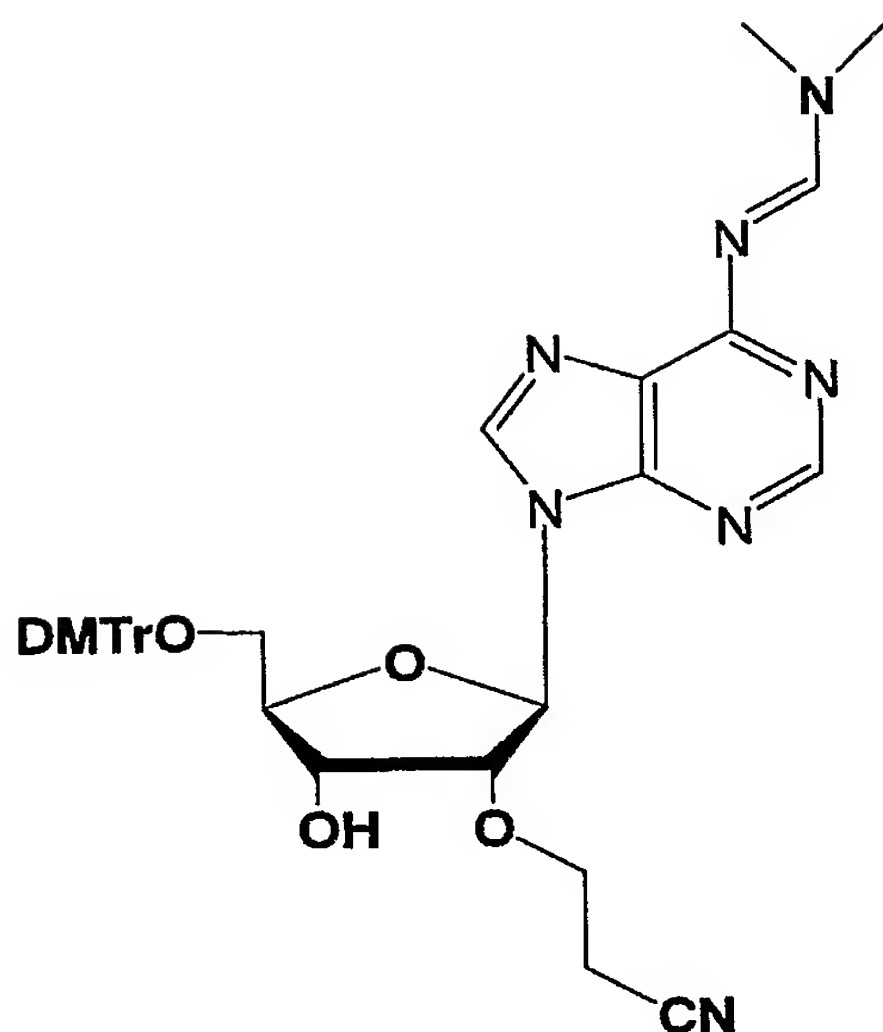
実施例 5 で得られた化合物 (716 mg, 1.91 mmol) をピリジン (19 ml) に溶解させた。そこにジメトキシトリチルクロリド (712 mg, 2.10 mmol) を加え 3 時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムで希釈し飽和食塩水並びに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。さらに水層をクロロホルムで 3 回逆抽出し有機層とあわせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ別した後、減圧濃縮し得られた残渣を得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (100:0 から 50:1 含 0.5% トリエチルアミン) で精製し化 11 の化合物：N6 - ジメチルアミノメチレン - 5' - O - ジメトキシトリチル - 2' - O - シアノエチルアデノシン (1132 mg, 87%) を得た。

【0047】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 2.52 - 2.59 (2H, m), 3.13 (3H, s), 3.18 (3H, s), 3.25 - 3.57 (2H, m), 3.72 (6H, s), 3.82 - 3.92 (2H, m), 4.20 - 4.24 (3H, m), 4.50 (1H, t), 4.60 (1H, dd), 6.14 (1H, d), 6.75 (4H, d), 7.13 - 7.47 (9H, m), 8.09 (1H, s), 8.43 (1H, s), 8.94 (1H, s)

【0048】

## 【化 1 1】



## 【0049】

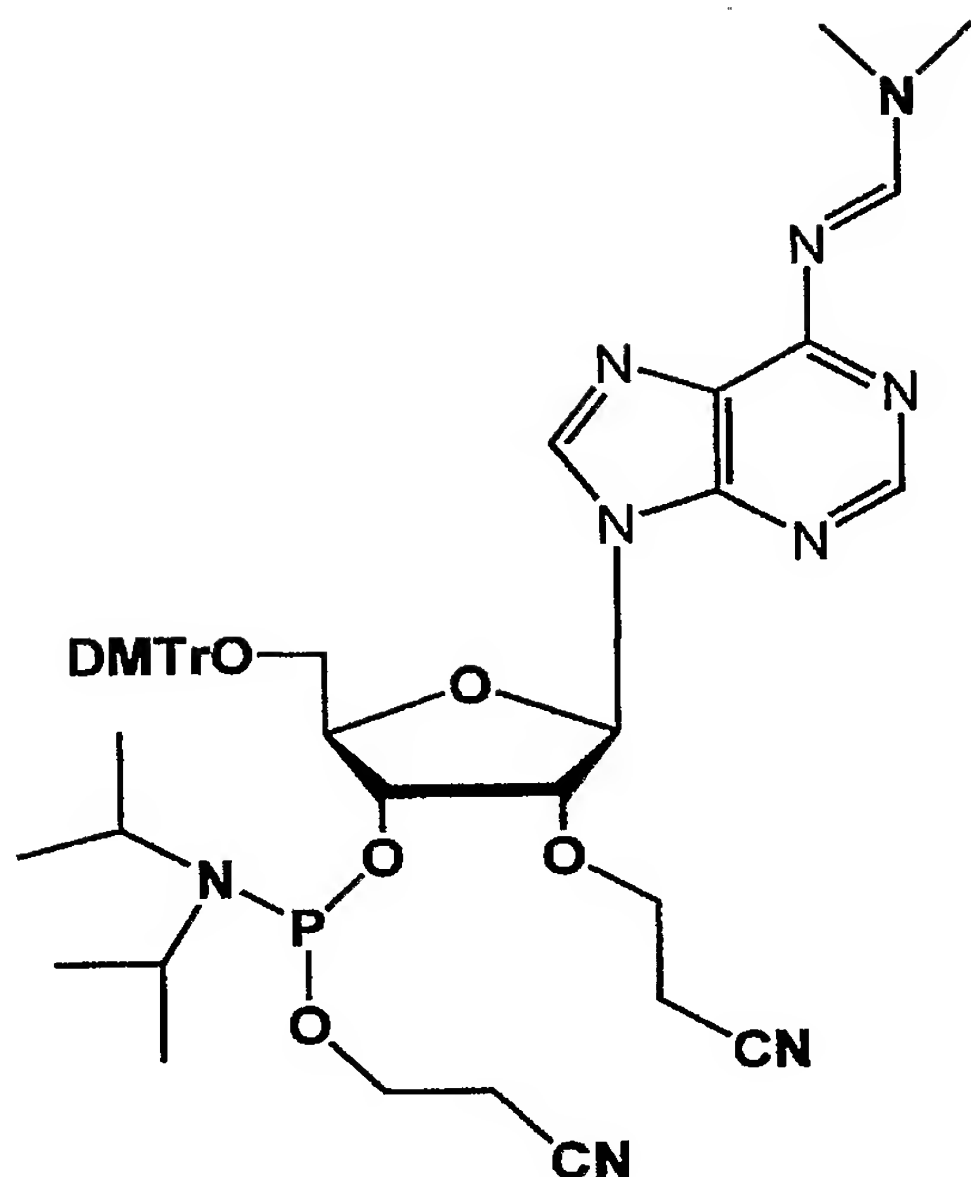
次に、アルゴン雰囲気下、五酸化ニリンを乾燥剤としてデシケータにて減圧乾燥させた上記化合物（1.06 g, 1.51 mmol）とテトラゾールジイソプロピルアンモニウム塩（193 mg, 2.25 mmol）を乾燥アセトニトリル（7 ml）に溶解させた。2-シアノエチルN, N, N, N-テトライソプロピルホスホロアミダイト（678 mg, 2.25 mmol）を乾燥アセトニトリル（3 ml）の溶液として反応系に滴下した。5時間撹拌した後、反応液をクロロホルムで希釈し飽和食塩水で2回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した。水層をクロロホルムで抽出し、得られた有機層を合わせて無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣を球状シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1 0.5% トリエチルアミン）で精製し白色泡状物質として化12の化合物：N6-ジメチルアミノメチレン-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-シアノエチルアデノシン-2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルホスホロアミダイト（896 mg）を収率82%で得た。

## 【0050】

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 1.06 - 1.18 (12H, m), 2.58 - 2.66 (4H, m), 3.21 (3H, s), 3.26 (3H, s), 3.32 - 3.35 (1H, m), 3.51 - 4.01 (14H, m), 4.34 - 4.39 (1H, m), 4.55 - 4.67 (1H, m), 4.80 - 4.85 (1H, m), 6.10 - 6.14 (1H, m), 6.76 - 6.83 (4H, t), 7.18 - 7.36 (9H, m), 8.09 - 8.12 (1H, m), 8.45 - 8.46 (1H, m), 8.95 - 8.96 (1H, m)

## 【0051】

## 【化 12】



## 【0052】

実施例 7: 2 ‘水酸基を修飾された RNA の合成 (4)’

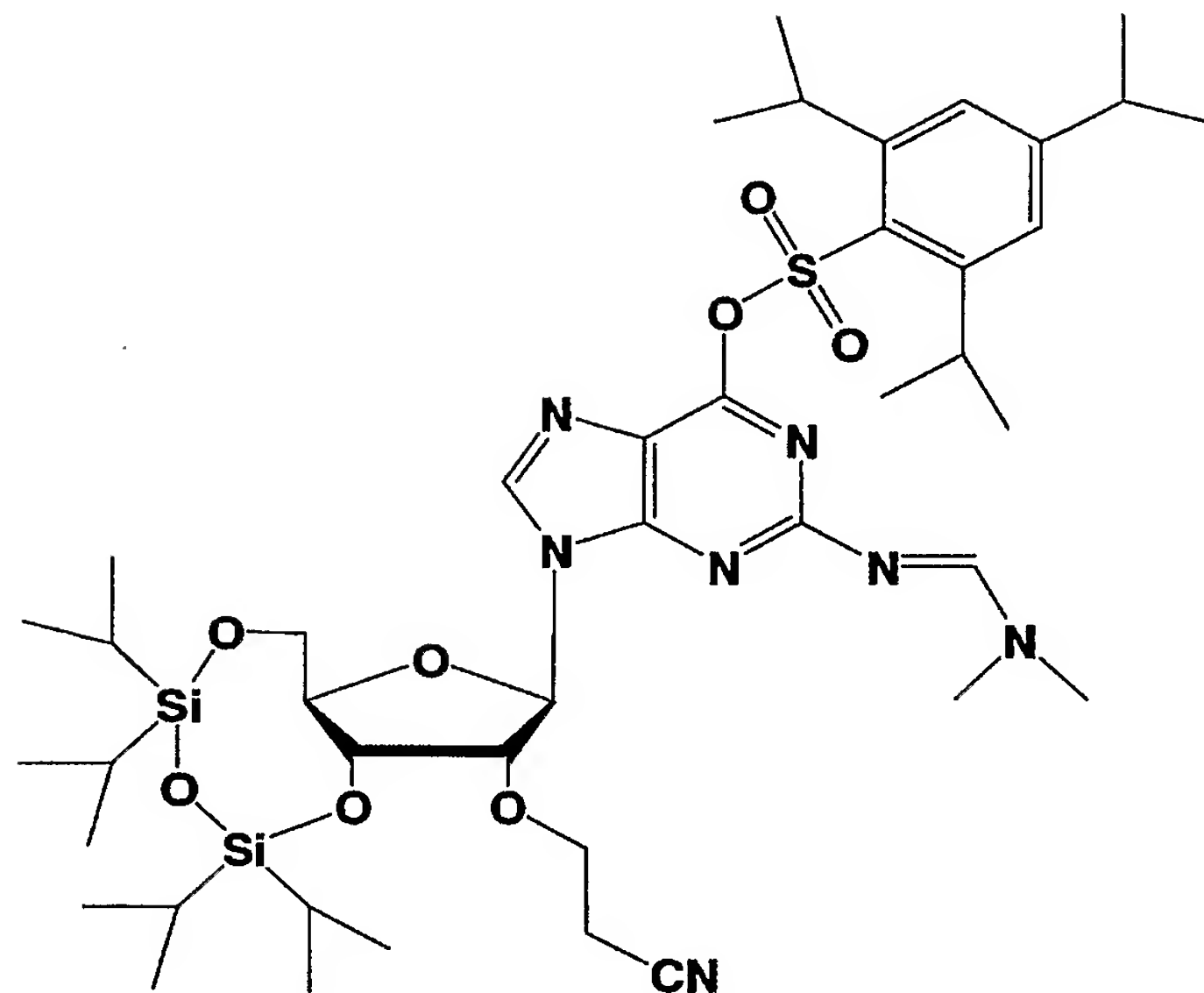
N2-ジメチルアミノメチレン-06-トリイソプロピルベンゼンスルホニル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリデン-グアノシン (6.60 g, 7.80 mmol) を t-ブチルアルコール (39 ml) に溶解させた。そこにアクリロニトリル (20 ml, 156 mmol)、引き続き炭酸セシウム (2.75 g, 7.80 mmol) を加え 2 時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール (100:1) で精製し化 13 の化合物: N2-ジメチルアミノメチレン-06-トリイソプロピルベンゼンスルホニル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリデン-2'-O-シアノエチルグアノシン (5.82 mg, 83%) を得た。

## 【0053】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 0.99 - 1.34 (46 H, m), 2.77 - 2.63 2.79 (2 H, t), 2.95 - 2.97 (1 H, m), 3.11 (3 H, s), 3.16 (3 H, s), 3.99 - 4.33 (9 H, m), 4.57 (1 H, dd), 6.18 (1 H, s), 7.23 (2 H, s), 8.04 (1 H, s), 8.23 (1 H, s)

## 【0054】

## 【化 13】



## 【0055】

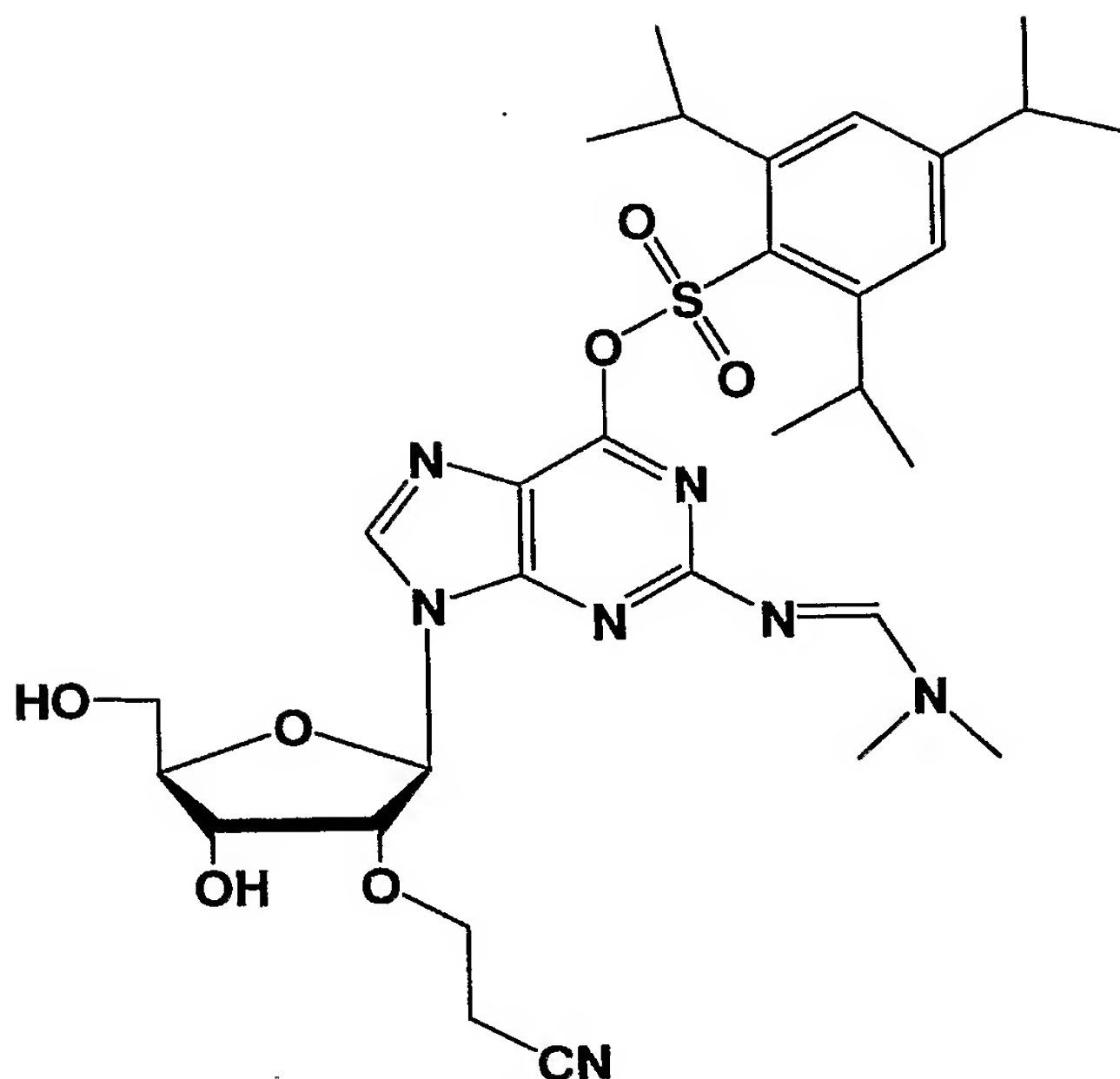
次に、上記化合物(113 mg, 0.126 mmol)をテトラヒドロフラン(1 ml)に溶解させた。そこにトリエチルアミン3フッ化水素(72  $\mu$ l, 0.442 mmol)、引き続きトリエチルアミン(31  $\mu$ l, 0.226 mmol)を加え1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール(100：0から50：1から10：1)で精製し化14の化合物：N2-ジメチルアミノメチレン-6-O-トリイソプロピルベンゼンスルホニル-2'-O-シアノエチルグアノシン(67 mg, 81%)を得た。

## 【0056】

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 1.22-1.31 (18H, m), 2.57-2.60 (2H, t), 2.81-2.96 (1H, m), 3.05 (3H, s), 3.12 (3H, s), 3.62-3.79 (3H, m), 3.93 (1H, d), 4.24 (2H, dt), 4.31 (1H, br), 4.62 (1H, m), 4.84 (1H, dd), 5.98-6.15 (2H, m), 7.23 (2H, s), 8.12 (1H, s), 8.20 (1H, s)

## 【0057】

## 【化14】



## 【0058】

実施例9: 2'-O-シアノエチルシチジン

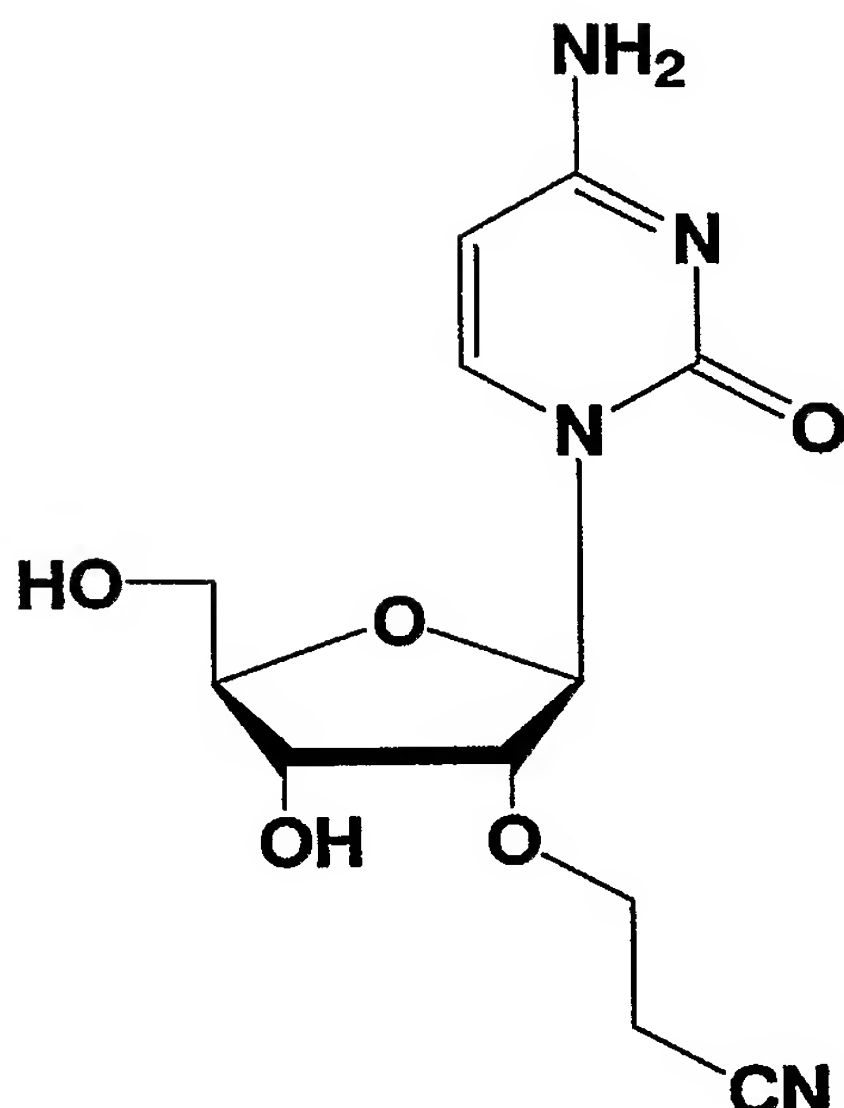
化7の化合物 (141 mg, 0.401 mmol) をアンモニア水: エタノール (4 ml, v/v = 3/1) に溶解させ1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム: メタノール (7:1) で精製し化15の化合物: 2'-O-シアノエチルシチジン (109 mg, 92%) を得た。

## 【0059】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) 2.83 - 2.86 (2H, m), 3.83 (1H, dd), 3.95 - 4.03 (3H, m), 4.14 - 4.18 (2H, m), 4.28 (1H, dd), 5.97 (1H, d), 6.05 (1H, dd), 7.88 (1H, d)

## 【0060】

## 【化 15】



## 【0061】

実施例 10: 2'-O-シアノエチルアデノシン

化 10 の化合物

(475 mg, 1.27 mmol) をアセトニトリルに溶解させヒドラジン (218  $\mu$ l, 7 mmol) を加えて 3 時間攪拌する。反応系に析出してきた粉体をイソプロピルアルコールで洗浄した。さらに炉液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム: メタノール (100:0  $\rightarrow$  50:1  $\rightarrow$  10:1) で精製し先ほどの粉体とあわせて化 16 の化合物: 2'-O-シアノエチルアデノシン (332 mg, 82%) を得た。

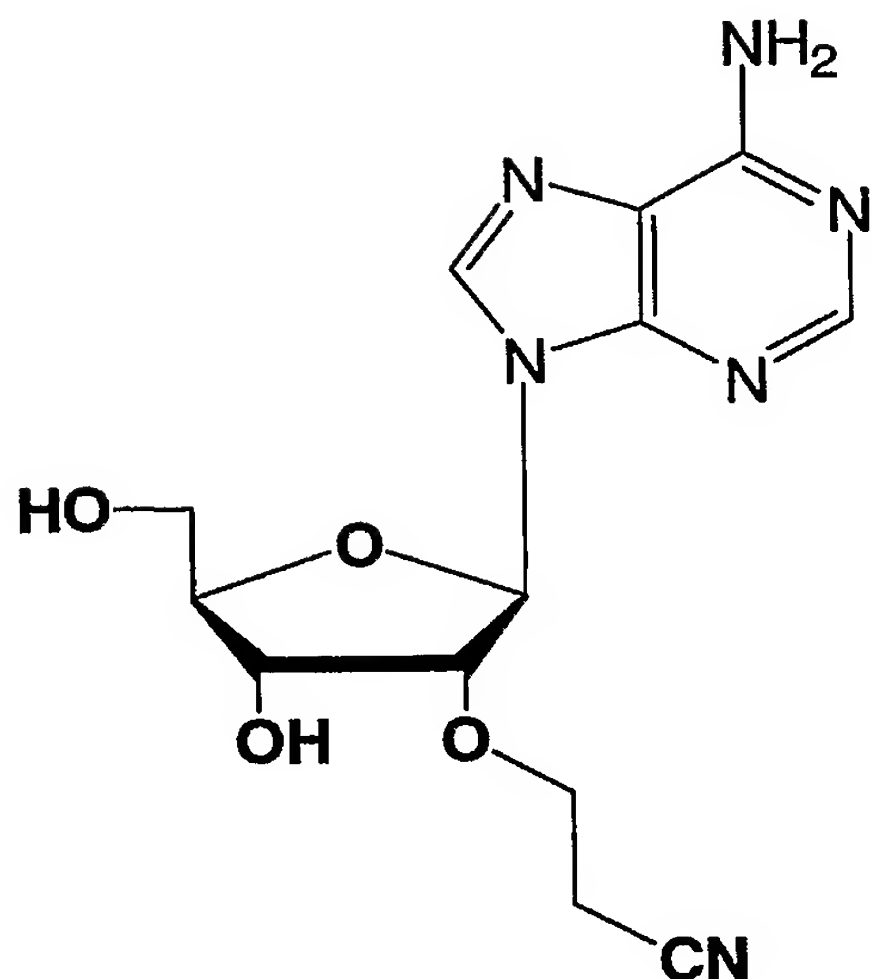
## 【0062】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) 2.83 - 2.86 (2H, m), 3.83 (1H, dd), 3.95 - 4.03 (3H, m), 4.14 - 4.18 (2H, m), 4.28 (1H, dd), 5.97 (1H, d), 6.05 (1H, dd), 7.88 (1H, d)

## 【0063】



## 【化16】



## 【0064】

実施例 11: 2'-O-シアノエチルグアノシン

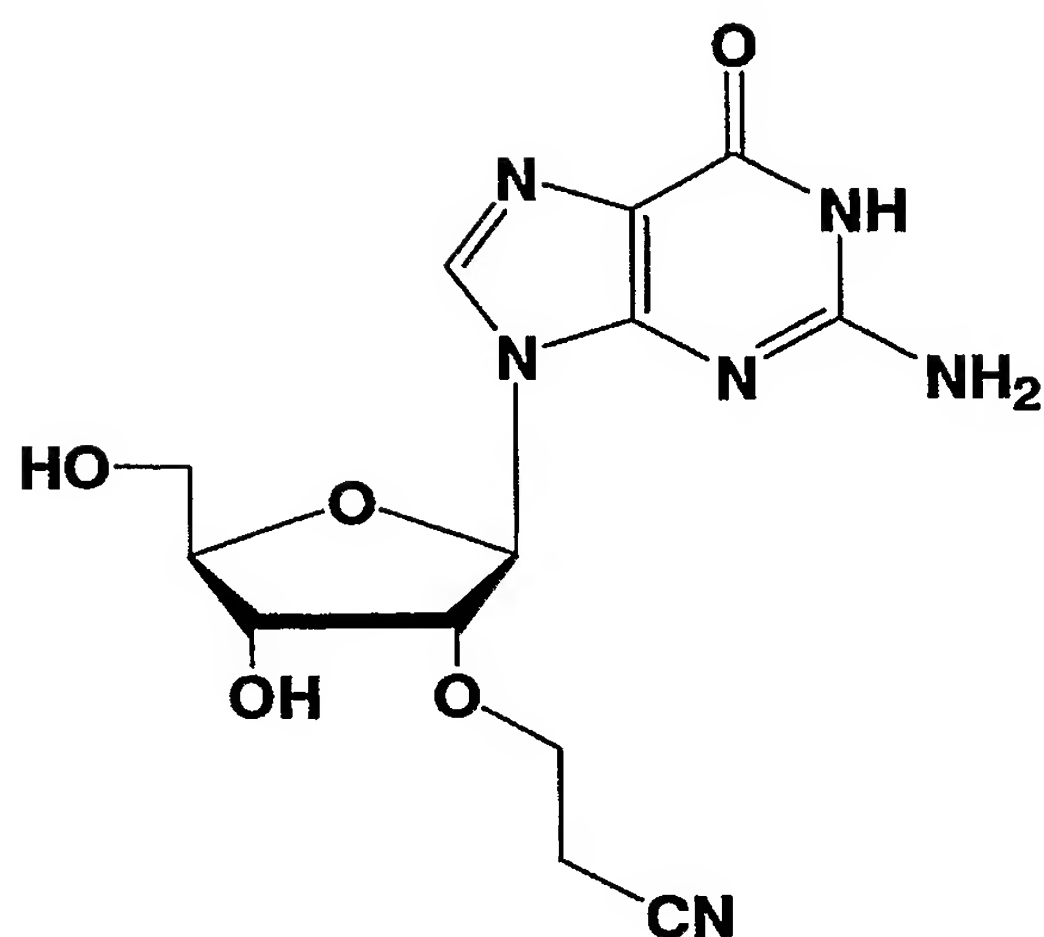
化14の化合物(447 mg, 0.680 mmol)をアセトニトリル 7 ml に溶解させオルトニトロベンズアルドオキシム(339 mg, 7 mmol)、テトラメチルグアニジン(85  $\mu$ l, 0.677 mmol)を加えて1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:0 $\rightarrow$ 50:1 $\rightarrow$ 20:1 $\rightarrow$ 10:1)で精製する。得られた化合物をアンモニア水:エタノール(5 ml, v/v=3:1)を加えて6時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し50%エタノール溶液から結晶化し化17の化合物:2'-O-シアノエチルグアノシン(121 mg, 53%)を得る。

## 【0065】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) 2.73 (2H, t), 3.76 - 3.95 (4H, m), 4.23 (1H, q), 4.50 (1H, dd), 4.52 (1H, t), 5.98 (1H, d), 8.04 (1H, s)

## 【0066】

【化 17】



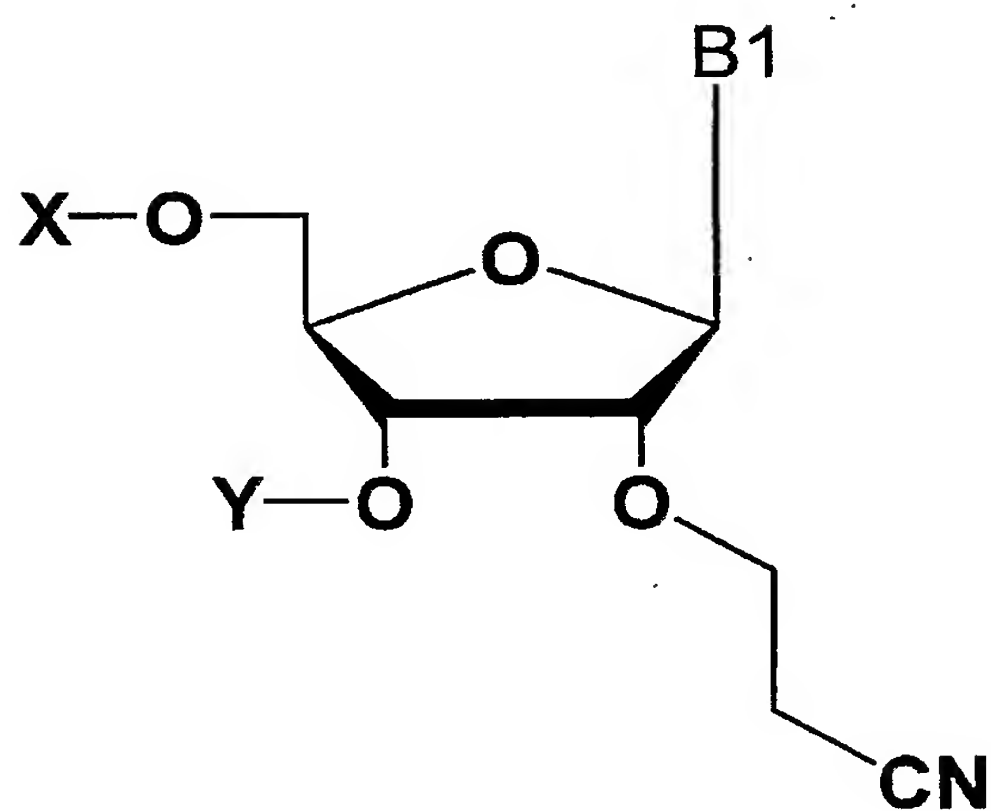
【産業上の利用可能性】

【0067】

本発明の合成方法で得られる、一般式 (I) で表されるヌクレオシドもしくはそのヌクレオチド:

【0068】

【化 18】



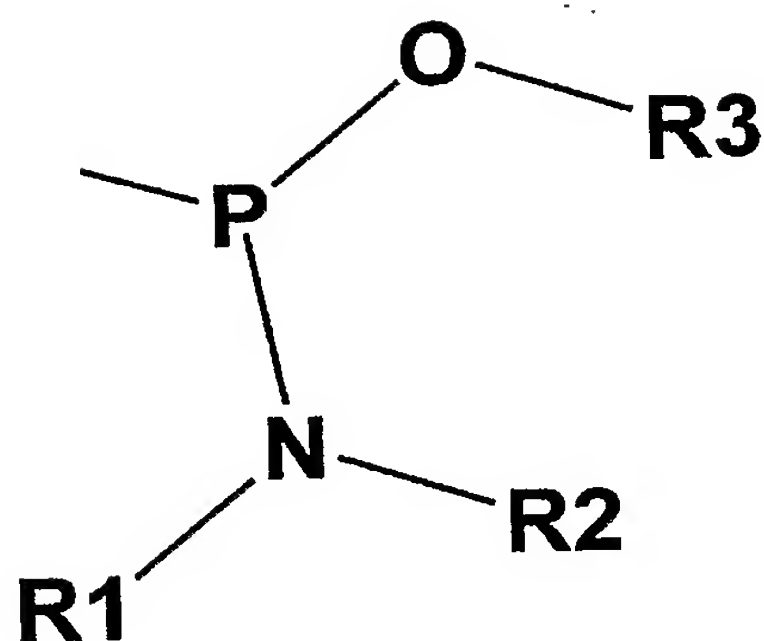
(I)

【0069】

(式 I 中、X 及び Y は同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4-メトキシトリチル基、4, 4'-ジメトキシトリチル基、又は一般式 (II) :

【0070】

【化 19】



(II)

【0071】

(式 (II) 中、R1およびR2は同一または異なって、炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、R1およびR2が互いに結合して環構造を形成し、R3はリン酸の保護基を表す) を表し、B1は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。) である修飾RNAは遺伝子制御のための人工RNA分子等として有用である。

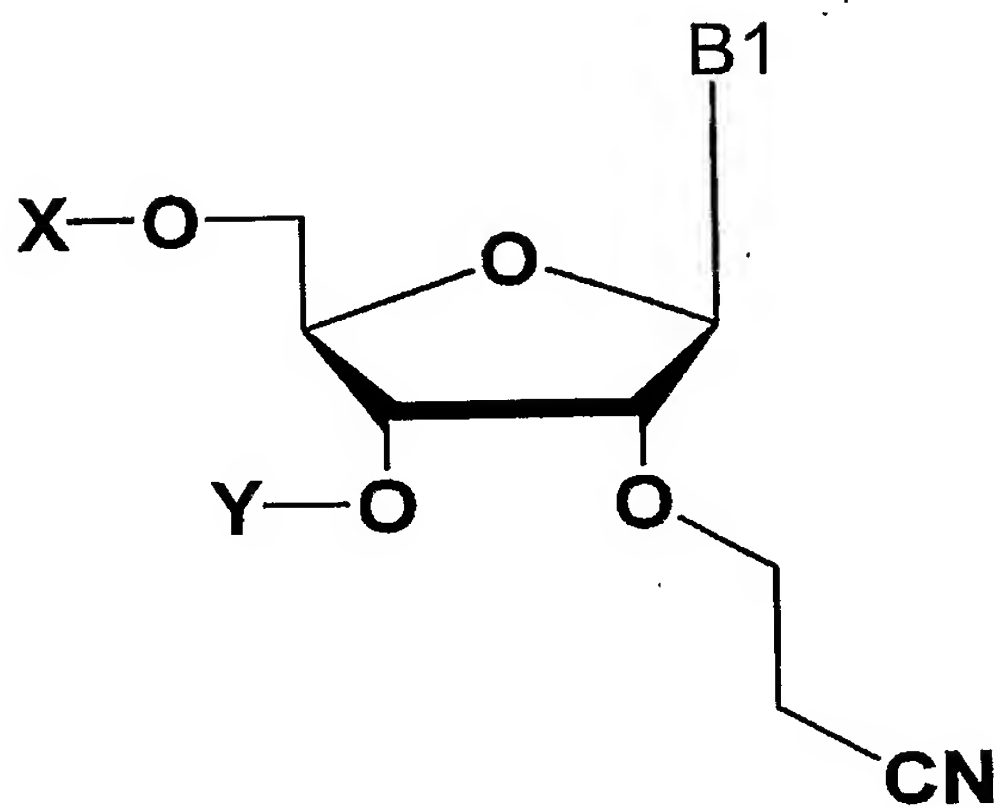
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 穏やかな条件で効率的にシアノエチルエーテルを構築する系、及び機能性官能基としての可能性を開拓し新規機能性核酸の創製に寄与すること。

【解決手段】 一般式 (I) で表されるヌクレオシドもしくはそのヌクレオチド：

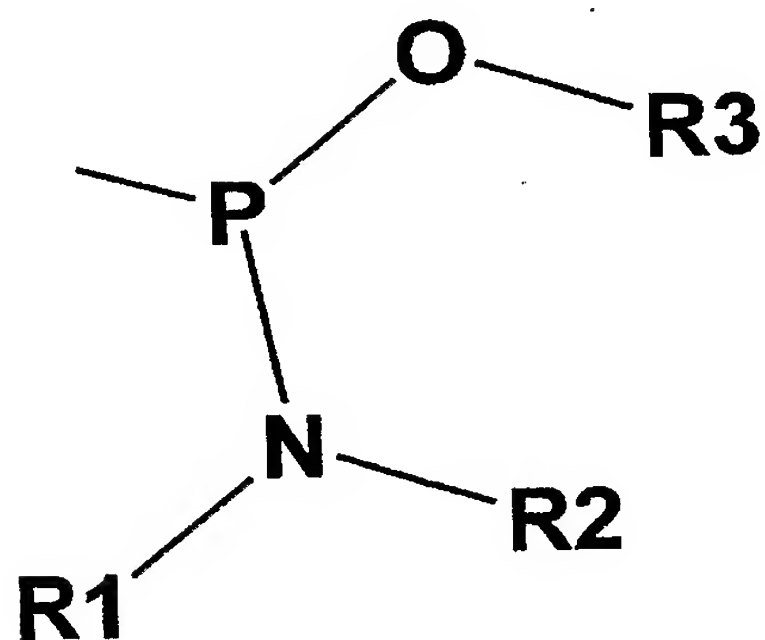
【化 1】



(I)

(式 I 中、X 及び Y は同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4-メトキシトリチル基、4, 4'-ジメトキシトリチル基、又は一般式 (I I) ) :

【化 2】



(I I)

(式 (I I) 中、R1 および R2 は同一または異なって、炭素数 1 から 7 のアルキル基を表すか、又は、R1 および R2 が互いに結合して環構造を形成し、R3 はリン酸の保護基を表す) を表し、B1 は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。)

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 6 0 2 6 1
受付番号	5 0 4 0 0 3 5 6 2 5 2
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0 0 9 5
作成日	平成 1 6 年 3 月 5 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成16年 3月 4日

特願 2 0 0 4 - 0 6 0 2 6 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 3 3 6 0 1 1 5 ]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 4 月 1 日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構